

22.08.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 10 OCT 2003

WISA PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 8 月 2 3 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 2 4 3 3 3 7
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 2 4 3 3 3 7]

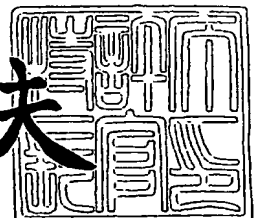
出 願 人
Applicant(s): 理化学研究所
 株式会社医学生物学研究所

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 9 月 2 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 A21482A

【提出日】 平成14年 8月23日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所内

 【氏名】 宮脇 敦史

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都板橋区徳丸3-10-8スカイプラザ202号室

 【氏名】 唐澤 智司

【特許出願人】

 【識別番号】 000006792

 【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

 【識別番号】 390004097

 【氏名又は名称】 株式会社医学生物学研究所

【代理人】

 【識別番号】 110000109

 【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス

 【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 170347

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【包括委任状番号】 0205404

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 色素蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来の下記の特性を有する色素蛋白質。

- (1) 吸収極大波長が 6 0 5 n m である；
- (2) 6 0 5 n m におけるモル吸光係数が 4 7 5 5 0 である；
- (3) 光吸収特性の p H 感受性が p H 5 ～ 1 0 で安定である；

【請求項 2】 以下の何れかのアミノ酸配列を有する色素蛋白質。

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有するアミノ酸配列；

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 に記載の蛋白質をコードする DNA。

【請求項 4】 以下の何れかの DNA。

- (a) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列をコードする DNA；又は、
- (b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする DNA；

【請求項 5】 以下の何れかの塩基配列を有する DNA。

- (a) 配列番号 2 に記載の塩基配列；又は、
- (b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列；

【請求項 6】 請求項 4 又は 5 に記載の DNA を有する組み換えベクター。

【請求項 7】 請求項 4 又は 5 に記載の DNA 又は請求項 6 に記載の組み換えベクターを有する形質転換体。

【請求項 8】 請求項 1 又は 2 に記載の色素蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛋白質。

【請求項 9】 請求項 1 又は 2 に記載の色素蛋白質をアクセプター蛋白質として用いて FRET（蛍光共鳴エネルギー転移）法を行うことを特徴とする、生理活性物質の分析方法。

【請求項 10】 請求項 1 又は 2 に記載の色素蛋白質、請求項 3 から 5 の何れかに記載の DNA、請求項 6 に記載の組み換えベクター、請求項 7 に記載の形質転換体、又は請求項 8 に記載の融合蛋白質を含む、吸光試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な色素蛋白質に関する。より詳細には、本発明は、ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来の新規な色素蛋白質及びその利用に関する。

【0002】

【従来の技術】

クラゲのエクオレア・ビクトリア (*Aequorea victoria*) に由来する緑色蛍光蛋白質 (GFP) は、生物系において多くの用途を有する。最近、ランダム突然変異誘発法および半合理的 (semi-rational) 突然変異誘発法に基づいて、色を変化させたり、折りたたみ特性を改善したり、輝度を高めたり、あるいは pH 感受性を改変したといった様々な GFP 変異体が作製されている。遺伝子組み換え技術により他の蛋白質を GFP 等の蛍光蛋白質に融合させて、それらの発現および輸送のモニタリングを行うことが行われている。

【0003】

最もよく使用される GFP 変異体の一つとして黄色蛍光蛋白質 (YFP) が挙げられる。YFP は、クラゲ (*Aequorea*) GFP 変異体の中でも最長波長の蛍光を示す。大部分の YFP の ϵ および Φ は、それぞれ $60,000 \sim 100,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ および $0.6 \sim 0.8$ であり (Tsien, R. Y. (1998). *Ann. Rev. Biochem.* 67, 509-544)、これらの値は、一般的な蛍光団（フルオレセインおよびローダミンなど）の値に匹敵する。従って YFP の絶対的輝度の改善は、ほぼ限界に達しつつある。

【0004】

また、GFP変異体の他の例として、シアン蛍光蛋白質（CFP）があり、ECFP（enhanced cyan fluorescent protein）が知られている。また、イソギンチャク（*Discoma* sp.）からは赤色蛍光蛋白質（RFP）も単離されており、Das Redが知られている。このように蛍光蛋白質は、緑色、黄色、シアン色、赤色の4種が次々と開発されスペクトルの範囲は大幅に広がっている。

【0005】

従来の蛍光蛋白質の量子収率を0に近づけたものが色素蛋白質である。色素蛋白質は、光エネルギーを他のエネルギーに変換する分子を細胞内に導入することができる点で様々な応用が可能である。しかしながら、色素蛋白質の吸収波長特性について報告されている例は少ない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ベリルイソギンチャク（*Anthopleura inornata*）に由来する、ある特定の波長の光を吸収する新規な色素蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために本発明者らは鋭意検討し、既知の蛍光蛋白質のアミノ酸配列の情報に基づいて好適なプライマーを設計し、緑色を呈するベリルイソギンチャク（*Anthopleura inornata*）のcDNAライブラリーから上記プライマーを用いて新規な色素蛋白質をコードする遺伝子を増幅してクローニングすることに成功した。さらに本発明者らは、得られたベリルイソギンチャク（*Anthopleura inornata*）由来の色素蛋白質の光吸収特性及びpH感受性を解析した。本発明は、これらの知見に基づいて完成したものである。

【0008】

即ち、本発明によれば、ベリルイソギンチャク（*Anthopleura inornata*）由来の下記の特性を有する色素蛋白質。

- (1) 吸収極大波長が605nmである；
- (2) 605nmにおけるモル吸光係数が47550である；

(3) 光吸収特性のpH感受性がpH5～10で安定である：

【0009】

本発明の別の側面によれば、以下の何れかのアミノ酸配列を有する色素蛋白質が提供される。

(a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列；又は、

(b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有するアミノ酸配列：

【0010】

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の蛋白質をコードするDNAが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、以下の何れかのDNAが提供される。

(a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、

(b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードするDNA：

【0011】

本発明のさらに別の側面によれば、以下の何れかの塩基配列を有するDNAが提供される。

(a) 配列番号2に記載の塩基配列；又は、

(b) 配列番号2に記載の塩基配列において1から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

【0012】

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のDNAを有する組み換えベクターが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のDNA又は組み換えベクターを有する形質転換体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の色素蛋白質と他の蛋白質とから成

る融合蛋白質が提供される。

【0013】

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の色素蛋白質をアクセプター蛋白質として用いてFRET（蛍光共鳴エネルギー転移）法を行うことを特徴とする、生理活性物質の分析方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の色素蛋白質、DNA、組み換えベクター、形質転換体、又は融合蛋白質を含む、吸光試薬キットが提供される。

【0014】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

(1) 本発明の色素蛋白質

本発明の色素蛋白質は、ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来のものであり、下記の特性を有することを特徴とする。

- (1) 吸収極大波長が605nmである；
- (2) 605nmにおけるモル吸光係数が47550である；
- (3) 光吸収特性のpH感受性がpH5～10で安定である；

【0015】

ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) は、96本の触手を有し、規則正しく配列している。また、口盤は触手と同色で口のまわりが赤茶色に彩色されるのが本種の特徴である。体壁には98列の吸着イボが並び、体壁の下端付近まで分布する。体壁の色には大きな変異があり、褐色系、ブルー系、ピンク系が知られている。ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) は、北海道南部から九州に分布し、潮間帯付近に多産する。

【0016】

なお、本書中以下の実施例では、ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) を出発材料として上記特性を有する色素蛋白質を単離したが、ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 以外のイソギンチャクから本発明の色素蛋白質を取得することができる場合もあり、そのような色素蛋白質も本発明の範囲内である。

【0017】

本発明の色素蛋白質は、以下の実施例で示す通り、吸収極大波長が605nmであり、また、605nmにおけるモル吸光係数は47550である。

モル吸光係数は蛍光分子1モルあたりの光子の吸収量を表す。量子収率は吸収した光子のどれだけを蛍光として発することができるかを表した数値である。本発明の色素蛋白質の量子収率は極めて低いため、蛍光は殆ど発しない。この性質から、本発明の色素蛋白質は、(1) FRETのアクセプター分子(エネルギー受容体)として用いたり、(2) 照射した光のエネルギーを光以外のエネルギーに変換させるシステムの開発に利用したり、あるいは(3) 蛋白質のアミノ酸配列に変異を導入して蛍光を発するように改変することなどに用いることができる。

【0018】

また、本発明の色素蛋白質は、光吸収特性のpH感受性がpH5~10で安定であることを特徴とする。即ち、本発明の色素蛋白質では、pH5~10の範囲において吸収スペクトルのピーク値の変動が少ない。従って、本発明の色素蛋白質は、広範囲のpH環境において同様の条件で 사용할ことができ、生体内での使用に際しての制約は少ない。

【0019】

本発明の色素蛋白質の具体例としては、以下の何れかのアミノ酸配列を有する色素蛋白質が挙げられる。

- (a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列；又は、
- (b) 配列番号1に記載のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有するアミノ酸配列：

【0020】

本明細書で言う「1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列」における「1から数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1から5個、特に好ましくは1から3個程度を意味する。

【0021】

本明細書で言う「吸光特性」とは、ある波長の光を吸収できる特性を意味し、例えば、本明細書に示した色素蛋白質と同様に吸収極大波長が605nmであってもよいし、あるいは吸収極大波長の値がシフトしたものであってもよい。なお、光吸収特性のpH感受性は、pH5～10で安定であることが好ましい。

【0022】

上記した通り、本発明の配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列を有する色素蛋白質は蛍光をほとんど発しないものである。本発明においては、配列番号1に記載したアミノ酸配列に対して1から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を導入することにより、より強い蛍光を発する蛋白質を作製してもよく、このような蛋白質も本発明の範囲内に含まれる。

【0023】

本発明の色素蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNA入手することが必要である。本明細書の配列表の配列番号1に記載したアミノ酸配列並びに配列番号2に記載した塩基配列の情報を利用することにより適当なプライマーを設計し、それらを用いて、ペリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来のcDNAライブラリーを鋳型にしてPCRを行うことにより、本発明の色素蛋白質をコードするDNAを取得することができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の色素蛋白質を産生することができる。発現系での発現については本明細書中後記する。

【0024】

(2) 本発明のDNA

本発明によれば、本発明の色素蛋白質をコードする遺伝子が提供される。

本発明の色素蛋白質をコードするDNAの具体例としては、以下の何れかのDNAが挙げられる。

(a) 配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードするDNA；又は、

(b) 配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする DNA :

【0 0 2 5】

本発明の色素蛋白質をコードする DNA の更なる具体例としては、以下の何れかの塩基配列を有する DNA が挙げられる。

(a) 配列番号 2 に記載の塩基配列；又は、

(b) 配列番号 2 に記載の塩基配列において 1 から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有し、吸光特性を有する蛋白質をコードする塩基配列：

【0 0 2 6】

本発明の DNA は、例えばホスホアミダイト法などにより合成することができ、特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって製造することもできる。本発明の DNA の作製方法については、本明細書中上述した通りである。

【0 0 2 7】

また、所定の核酸配列に所望の変異を導入する方法は当業者に公知である。例えば、部位特異的変異誘発法、縮重オリゴヌクレオチドを用いる PCR、核酸を含む細胞の変異誘発剤又は放射線への露出等の公知の技術を適宜使用することによって、変異を有する DNA を構築することができる。このような公知の技術は、例えば、Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY., 1989、並びに Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1~38, John Wiley & Sons (1987-1997) に記載されている。

【0 0 2 8】

(3) 本発明の組み換えベクター

本発明の DNA は適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター (例えばプラスミド等) でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主

細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

【0029】

好ましくは、本発明で用いるベクターは発現ベクターである。発現ベクターにおいて本発明のDNAは、転写に必要な要素（例えば、プロモーター等）が機能的に連結されている。プロモータは宿主細胞において転写活性を示すDNA配列であり、宿主の種類に応じて適宜することができる。

【0030】

細菌細胞で作動可能なプロモータとしては、バチルス・ステアロテルモフィルス・マルトジェニック・アミラーゼ遺伝子(*Bacillus stearothermophilus maltogenic amylase gene*)、バチルス・リケニホルミス α アミラーゼ遺伝子(*Bacillus licheniformis alpha-amylase gene*)、バチルス・アミロリケファチエンス・BANアミラーゼ遺伝子(*Bacillus amyloliquefaciens BAN amylase gene*)、バチルス・サブチリス・アルカリプロテアーゼ遺伝子(*Bacillus Subtilis alkaline protease gene*)もしくはバチルス・プミルス・キシロシダーゼ遺伝子(*Bacillus pumilus xylosidase gene*)のプロモータ、またはファージ・ラムダのP_R若しくはP_Lプロモータ、大腸菌の *lac*、*trp*若しくは*tac*プロモータなどが挙げられる。

【0031】

哺乳動物細胞で作動可能なプロモータの例としては、SV40プロモータ、MT-1（メタロチオネイン遺伝子）プロモータ、またはアデノウイルス2主後期プロモータなどがある。昆虫細胞で作動可能なプロモータの例としては、ポリヘドリンプロモータ、P10プロモータ、オートグラフィア・カリホルニカ・ポリヘドロシス塩基性タンパクプロモータ、バキュウロウイルス即時型初期遺伝子1プロモータ、またはバキュウロウイルス39K遅延型初期遺伝子プロモータ等がある。酵母宿主細胞で作動可能なプロモータの例としては、酵母解糖系遺伝子由来のプロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ、TP11プロモータ、ADH2-4cプロモータなどが挙げられる。

糸状菌細胞で作動可能なプロモータの例としては、ADH3プロモータまたは*t p i A*プロモータなどがある。

【0032】

また、本発明のDNAは必要に応じて、例えばヒト成長ホルモントーミネータまたは真菌宿主についてはTP I 1ターミネータ若しくはADH3ターミネータのような適切なターミネータに機能的に結合されてもよい。本発明の組み換えベクターは更に、ポリアデニレーションシグナル(例えばSV40またはアデノウイルス5E1b領域由来のもの)、転写エンハンサ配列(例えばSV40エンハンサ)および翻訳エンハンサ配列(例えばアデノウイルスVA RNAをコードするもの)のような要素を有していてもよい。

本発明の組み換えベクターは更に、該ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にするDNA配列を具備してもよく、その一例としてはSV40複製起点(宿主細胞が哺乳類細胞のとき)が挙げられる。

【0033】

本発明の組み換えベクターはさらに選択マーカ含有してもよい。選択マーカとしては、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)またはシゾサッカロマイセス・ボンベTP I遺伝子等のようなその補体が宿主細胞に欠けている遺伝子、または例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン若しくはヒグロマイシンのような薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。

本発明のDNA、プロモータ、および所望によりターミネータおよび／または分泌シグナル配列をそれぞれ連結し、これらを適切なベクターに挿入する方法は当業者に周知である。

【0034】

(4) 本発明の形質転換体

本発明のDNA又は組み換えベクターを適当な宿主に導入することによって形質転換体を作製することができる。

本発明のDNAまたは組み換えベクターを導入される宿主細胞は、本発明のDNA構築物を発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌および高等真核細胞等が挙げられる。

【0035】

細菌細胞の例としては、バチルスまたはストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。これら細菌の形質転換は、プロトプラスト法、または公知の方法でコンピテント細胞を用いることにより行なえばよい。

哺乳類細胞の例としては、HEK 293細胞、HeLa細胞、COS細胞、BHK細胞、CHL細胞またはCHO細胞等が挙げられる。哺乳類細胞を形質転換し、該細胞に導入されたDNA配列を発現させる方法も公知であり、例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。

【0036】

酵母細胞の例としては、サッカロマイセスまたはシゾサッカロマイセスに属する細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)またはサッカロマイセス・クルイベリ(*Saccharomyces kluyveri*)等が挙げられる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

【0037】

他の真菌細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギルス、ニューロスボラ、フザリウム、またはトリコデルマに属する細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、DNA構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることにより形質転換を行うことができる。DNA構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。

【0038】

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる(例えば、*Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*; 及びカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、*Bio/Technology*, 6, 47(1988)等に記載)。

【0039】

バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフィ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、*Spodoptera frugiperda*の卵巣細胞である *Sf9*、*Sf21*〔バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー(W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク(New York)、(1992)〕、*Trichoplusia ni*の卵巣細胞である *HiFive* (インビトロジェン社製)等を用いることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法等を挙げることができる。

【0040】

上記の形質転換体は、導入されたDNA構築物の発現を可能にする条件下で適切な栄養培地中で培養する。形質転換体の培養物から、本発明の蛋白質を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破碎機等により細胞を破碎し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース等のレジンをを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンをを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンをを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【0041】

(5) 本発明の色素蛋白質及びそれを含む融合蛋白質の利用

本発明の色素蛋白質は、他の蛋白質と融合させることにより、融合蛋白質を構築することができる。本発明の色素蛋白質に融合させる他の蛋白質の種類は特に限定されないが、他の分子と相互作用する蛋白質であることが好ましく、例えば、受容体蛋白質又はそのリガンド、あるいは抗原又は抗体などが挙げられる。

本発明の融合蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

【0042】

組み換え融合蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするDNAを入手することが必要である。本発明の色素蛋白質をコードするDNAおよびそれに融合すべき他の蛋白質をコードするDNAは、本明細書中上記した方法またはそれに準じてそれぞれ入手することができる。次いで、これらのDNA断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の融合蛋白質をコードするDNAを得ることができる。このDNAを適当な発現系に導入することにより、本発明の融合蛋白質を産生することができる。

【0043】

分子間の相互作用を分析する手法の一つとして、FRET（蛍光共鳴エネルギー転移）が知られている。FRETでは、例えば、第一の蛍光蛋白質としてのシアン蛍光蛋白質（CFP）で標識した第一の分子と、第二の蛍光蛋白質としての黄色蛍光蛋白質（YFP）で標識した第二の分子とを共存させることにより、黄色蛍光蛋白質（YFP）をアクセプター分子として作用させ、シアン蛍光蛋白質（CFP）をドナー分子として作用させ、両者の間でFRET（蛍光共鳴エネルギー転移）を生じさせることにより、第一の分子と第二の分子との間の相互作用を可視化することができる。即ち、FRETでは2種類の分子にそれぞれ異なる色素を導入し、エネルギーレベルの高い方の色素（ドナー分子）を選択的に励起し、その色素の蛍光を測定し、もう一方の色素（アクセプター分子）からの長波長蛍光も測定して、それらの蛍光変化量によって分子間の相互作用を可視化する。両方の色素が、2種類の分子の相互作用によって近接したときのみドナー分子

の蛍光の減少とアクセプター分子の蛍光の増加が1波長励起2波長測光法により観測される。しかし、アクセプター分子に色素蛋白質を用いた場合は、両方の色素が、2種類の分子の相互作用によって近接したときのみドナー分子の蛍光の減少を生じ1波長励起1波長測光法により観測することができる。即ち、測定機器の簡易化が可能となる。

【0044】

本発明の色素蛋白質は、特に、FRET（蛍光共鳴エネルギー転移）におけるアクセプター分子としての利用価値が高い。即ち、本発明の色素蛋白質と被験物質との融合体（第一の融合体）を作製する。次いで、該被験物質と相互作用する別の被験物質と別の蛍光蛋白質との融合体（第2の融合体）を作製する。そして、第一の融合体と第2の融合体とを相互作用させ、発する蛍光を分析することにより、上記2種類の被験物質間の相互作用を分析することができる。なお、本発明の色素蛋白質を用いたFRET（蛍光共鳴エネルギー転移）は、試験管内で行ってもよいし、細胞内で行ってもよい。

【0045】

（6）本発明のキット

本発明によれば、本明細書に記載した色素蛋白質、融合蛋白質、DNA、組み換えベクター又は形質転換体から選択される少なくとも1種以上を含むことを特徴とする、吸光試薬キットが提供される。本発明のキットは、それ自体既知の通常用いられる材料及び手法で調製することができる。

色素蛋白質又はDNAなどの試薬は、適当な溶媒に溶解することにより保存に適した形態に調製することができる。溶媒としては、水、エタノール、各種緩衝液などを用いることができる。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【0046】

【実施例】

実施例1：イソギンチャクからの新規色素蛋白遺伝子の単離

（1）total RNAの抽出

イソギンチャクより色素蛋白遺伝子の単離を行った。材料には緑色を呈する 1 個体のベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) を用いた。凍結したベリルイソギンチャクを乳鉢で碎き、湿重量 1 グラムに "TRIzol" (GIBCO BRL) を 7.5 ml 加えてホモジナイズし、1500xg で 10 分間遠心した。上清にクロロホルム 1.5 ml を加え、15 秒間攪拌した後、3 分間静置した。7500xg で 15 分間遠心した。上清にイソプロパノール 3.75 ml を加え、15 秒間攪拌した後、10 分間静置した。17000xg で 10 分間遠心した。上清を捨て 70% エタノールを 6 ml 加えて 17000xg で 10 分間遠心した。上清を捨て沈殿を DEPC 水 200 μ l で溶解した。DEPC 水で溶解した total RNA を 100 倍に希釈して O.D. 260 と O.D. 280 の値を測定して RNA 濃度を測った。2.2 mg の total RNA を得た。

【0047】

(2) First strand cDNA の合成

total RNA 4 μ g を使用し、First strand cDNA の合成キット "Ready To Go" (Amersham Pharmacia) により cDNA (33 μ l) を合成した。

【0048】

(3) Degenerated PCR

合成した First strand cDNA (33 μ l) のうち 3 μ l を鋳型として PCR を行った。プライマーのデザインは既知の蛍光蛋白のアミノ酸配列を見比べて、似ている部分を抜き出し、塩基配列に変換し直し作製した。

【0049】

使用プライマー

5' - GAAGGRTGYGTCAAYGGRCAY -3' (primer1) (配列番号 3)

5' - ACVGGDCCATYDGVAAGAAARTT -3' (primer2) (配列番号 4)

I はイノシン、R は A 又は G、Y は C 又は T、V は A、C 又は G、D は A、G 又は T、S は C 又は G、H は A、T 又は C を示す。

【0050】

PCR 反応液組成

テンプレート (first strand cDNA) 3 μ l

X10 taq バッファー 5 μ l

2.5mM dNTPs	4 μ l
100 μ M primer1	1 μ l
100 μ M primer2	1 μ l
ミリQ	35 μ l
taq polymerase(5U/ μ l)	1 μ l

【0051】

PCR反応条件

94℃ 1分(PAD)

94℃ 30秒(変性)

52℃ 30秒(プライマーの鋳型へのアニーリング)

72℃ 1分(プライマー伸長)

上記3ステップを30サイクル行い、アニーリング温度を1サイクルごとに0.3℃下げた。30サイクル時の温度は43℃。

72℃ 7分(最後の伸長)

4℃で保持

【0052】

一回目のPCR反応で得られた増幅産物1 μ lをテンプレートとして、もう一度同じ条件でPCRを行った。アガロースゲル電気泳動で、350bpを切り出し、精製した。

【0053】

(4) サブクローニング及び塩基配列の決定

精製したDNA断片をpT7-blue vector(Novagen)にライゲーションした。大腸菌株(TG1)にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌よりplasmid DNAを精製して、挿入されたDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーにより決定した。得られた塩基配列を他の蛍光蛋白遺伝子の塩基配列と比較してそのDNA塩基配列が蛍光蛋白由来のものであるかを判断した。蛍光蛋白遺伝子の一部であると判断したものに関して、5'-RACE法および3'-RACE法による遺伝子全長のクローニングを行った。

【0054】

(5) 5'-RACE法

Degenerated PCRで得られたDNA断片の5'側の塩基配列を決定するために5'-RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (GIBCO BRL)を用いて、5'-RACE法を行った。鋳型として(1)で調製したtotal RNAを4 μ g使用した。

dC-tailed cDNAの一回目の増幅には

5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3' (primer3) (配列番号5)

5'-AAGAGACTCCTTGAAGTAATCGGGA-3' (primer4) (配列番号6)

のプライマーを用いた。

Iはイノシンを示す。

【0055】

二回目の増幅には

5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3' (primer5) (配列番号7)

5'-AAAATATCGTACGCAAAGGG-3' (primer6) (配列番号8)

のプライマーを用いた。PCR反応条件等はキットのプロトコールに準じた。

【0056】

アガロースゲル電気泳動で、増幅された200bpのバンドを切り出し、精製した。精製したDNA断片をpT7-blue vector (Novagen)にライゲーションした。大腸菌株(TG1)にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセクションを行い、白いコロニーの大腸菌よりplasmid DNAを精製して、挿入されたDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーにより決定した。

【0057】

(6) 3'-RACE法

Degenerated PCRで得られたDNA断片の3'側部分は、(4)の塩基配列決定で得られた情報を基に作製したプライマーとオリゴdTプライマーのPCRで得た。鋳型として(2)で調製したfirst strand cDNAを3 μ l使用した。

作成したプライマーは、

5'-AGGAGGTCCGCTACCCTTTG-3' (primer7) (配列番号9)

【0058】

PCR反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 taq バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
20 μ M primer7	1 μ l
10 μ M オリゴdTprimer	1 μ l
ミリQ	35 μ l
taq polymerase(5U/ μ l)	1 μ l

【0059】

PCR反応条件

94℃ 1分(PAD)

94℃ 30秒(変性)

52℃ 30秒 (プライマーの鋳型へのアニーリング)

72℃ 1分 (プライマ伸長)

上記3ステップを30サイクル行った。

72℃ 7分 (最後の伸長)

4℃で保持

【0060】

アガロースゲル電気泳動で、増幅された約1000bpのバンドを切り出し、精製した。精製したDNA断片をpT7-blue vector(Novagen)にライゲーションした。大腸菌株 (TG1) にトランスフォーメーションしてブルーホワイトセレクションを行い、白いコロニーの大腸菌より plasmid DNAを精製して、挿入されたDNA断片の塩基配列をDNAシーケンサーにより決定した。得られた全長の塩基配列を配列表の配列番号2に示し、全長のアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

【0061】

実施例2：大腸菌での蛋白発現

得られた全長の塩基配列より、蛋白のN末端に相当する部分でプライマーを作製し、C末端側はオリゴdTプライマーを使用して、実施例1の(2)で調製した First strand cDNAを鋳型としてPCRを行った。

使用プライマー

5'- CCCGGATCCGACCATGGCTACCTTGGTTAAAGA -3' (primer8) (配列番号10)

【0062】

PCR反応液組成

テンプレート (first strand cDNA)	3 μ l
X10 pyrobest バッファー	5 μ l
2.5mM dNTPs	4 μ l
100 μ M primer8	1 μ l
100 μ M オリゴdTプライマー	1 μ l
ミリQ	35 μ l
pyrobest polymerase(5U/ μ l)	1 μ l

【0063】

PCR反応条件

94℃ 1分(PAD)

94℃ 30秒(変性)

52℃ 30秒(プライマーの鋳型へのアニーリング)

72℃ 1分(プライマー伸長)

上記3ステップを30サイクル行った。

72℃ 7分(最後の伸長)

4℃で保持

【0064】

アガロースゲルの電気泳動で、増幅された約1100bpのバンドを切り出し、精製してpRSET vector(Invitrogen)のBamHI、EcoRI部位にサブクローニングして、大腸菌株(JM109-DE3)で発現させた。発現蛋白はN末端にHis-tagが付くようにコンストラクトしたので発現蛋白はNi-Agarose gel(QIAGEN)で精製した。精製の方法は付属のプロトコールに準じた。この色素蛋白質をBe-Gと命名する。以下の実施例3では、精製した蛋白の性質を解析した。

【0065】

実施例3:色素蛋白質(Be-G)の性質

(1) 光吸収特性の解析

20 μ M色素蛋白 (B e - G)、50mM HEPES pH7.9溶液を用いて吸収スペクトルを測定した。このスペクトルのピークの値よりモル吸光係数を計算した。緑色個体由来色素蛋白 (B e - G) では605nmに吸収のピークが認められた (表1、図1)。

【0066】

【表1】

	吸収極大	蛍光極大	モル吸光係数	量子収率	pH感受性	アミノ酸数
Be-G	605nm	-	47550(605nm)	-	>pH5でなし	229a.a.

【0067】

(2) pH感受性の測定

50mMの下記の緩衝液中で蛋白質の吸収スペクトルを測定した (図2)。

各pHの緩衝液は次の通り、

pH4、5 : 酢酸バッファー

pH6 : リン酸バッファー

pH7、8 : HEPESバッファー

pH9、10 : グリシンバッファー

図2の結果から分かるように、pH5~10でピークの値は安定していた。

【0068】

【発明の効果】

本発明により、ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来の新規な色素蛋白質が提供されることになった。本発明の色素蛋白質は所定の吸光特性を有し、またpH感受性が低いことから、分子生物学的分析において有用である。また、本発明の色素蛋白質の吸収度 (モル吸光係数) は著しく大きいため、光エネルギーの高効率な変換が可能である。また、遺伝子改変技術によって本発明の色素蛋白質の量子収率を1に近づけることもであり、その場合、新規な蛍光蛋白質を作製することができる。

【0069】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Chromo protein

<130> A21482A

<160> 10

【 0 0 7 0 】

<210> 1

<211> 229

<212> PRT

<213> Anthopleura inornata

<400> 1

Met Ala Thr Leu Val Lys Glu Thr Met Arg Ile Lys Met Ser Met Glu

1 5 10 15

Gly Thr Val Asn Gly His His Phe Lys Cys Glu Gly Gln Gly Glu Gly

20 25 30

Lys Pro Phe Glu Gly Tyr Gln Val Glu Lys Ile Arg Val Thr Glu Gly

35 40 45

Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Thr Leu Thr Pro Cys Trp Met Tyr

50 55 60

Gly Ser Lys Thr Phe Ile Lys His Thr Ser Gly Ile Pro Asp Tyr Phe

65 70 75 80

Lys Glu Ser Leu Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg Thr Gln Ile Tyr

85 90 95

Glu Asp Gly Gly Cys Leu Thr Ile His Gln Asp Thr Ser Met Gln Gly

100 105 110

Asp Cys Phe Ile Phe Lys Ile Lys Val Ile Gly Thr Asn Phe Pro Ala

115 120 125

Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Ala Gly Trp Glu Pro Cys Val

130 135 140

Glu Met Leu Tyr Pro Arg Ala Gly Val Leu Cys Gly Gln Ser Leu Met
 145 150 155 160
 Ala Leu Lys Cys Lys Asp Gly Asn His Leu Thr Cys His Leu Arg Thr
 165 170 175
 Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Ala Gly Gln Lys Met Pro Glu Phe His Phe
 180 185 190
 Gly Asp His Arg Ile Glu Ile Leu Lys Glu Glu Glu Gln Gly Met Arg
 195 200 205
 Ile Glu Gln Tyr Glu Ala Ala Val Ala Arg Tyr Cys Glu Ala Pro Ser
 210 215 220
 Arg Leu Gly His His
 225

【 0 0 7 1 】

<210> 2

<211> 690

<212> DNA

<213> Anthopleura inornata

<400> 2

atg gct acc ttg gtt aaa gaa act atg cgc atc aag atg agt atg gaa 48
 Met Ala Thr Leu Val Lys Glu Thr Met Arg Ile Lys Met Ser Met Glu
 1 5 10 15
 ggg acg gtt aat gga cac cac ttc aag tgt gaa gga caa gga gag ggc 96
 Gly Thr Val Asn Gly His His Phe Lys Cys Glu Gly Gln Gly Glu Gly
 20 25 30
 aag cct ttt gaa ggt tac cag gtc gaa aag att aga gtt act gaa gga 144
 Lys Pro Phe Glu Gly Tyr Gln Val Glu Lys Ile Arg Val Thr Glu Gly
 35 40 45
 ggt ccg cta ccc ttt gcg tac gat act ttg aca cct tgc tgg atg tat 192
 Gly Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Thr Leu Thr Pro Cys Trp Met Tyr

50	55	60	
gga agt aaa acc ttc atc aag cat aca tca gga att ccc gat tac ttc			240
Gly Ser Lys Thr Phe Ile Lys His Thr Ser Gly Ile Pro Asp Tyr Phe			
65	70	75	80
aag gag tct ctt cct gaa ggc ttt act tgg gaa aga acg caa atc tac			288
Lys Glu Ser Leu Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg Thr Gln Ile Tyr			
85	90	95	
gag gat gga ggc tgt ctt act att cac cag gac aca agc atg cag gga			336
Glu Asp Gly Gly Cys Leu Thr Ile His Gln Asp Thr Ser Met Gln Gly			
100	105	110	
gat tgt ttt att ttc aag ata aaa gtc att ggt acc aac ttt cct gcc			384
Asp Cys Phe Ile Phe Lys Ile Lys Val Ile Gly Thr Asn Phe Pro Ala			
115	120	125	
aat ggt ccc gtg atg cag aag aaa aca gca gga tgg gag cca tgc gtt			432
Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Ala Gly Trp Glu Pro Cys Val			
130	135	140	
gag atg ctt tat cct cgt gcc ggt gtc ttg tgt gga cag tcg ttg atg			480
Glu Met Leu Tyr Pro Arg Ala Gly Val Leu Cys Gly Gln Ser Leu Met			
145	150	155	160
gcc ctg aaa tgc aag gat ggc aac cac ctg acg tgc cat ctg cga act			528
Ala Leu Lys Cys Lys Asp Gly Asn His Leu Thr Cys His Leu Arg Thr			
165	170	175	
acc tac agg tcc aga aag gca gga caa aaa atg cca gag ttc cat ttc			576
Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Ala Gly Gln Lys Met Pro Glu Phe His Phe			
180	185	190	
ggg gat cat cgt att gag atc ctg aag gaa gaa gaa caa ggc atg cgt			624
Gly Asp His Arg Ile Glu Ile Leu Lys Glu Glu Glu Gln Gly Met Arg			
195	200	205	
att gaa caa tac gag gca gcg gtg gcg agg tac tgc gaa gct cca tcc			672

Ile Glu Gln Tyr Glu Ala Ala Val Ala Arg Tyr Cys Glu Ala Pro Ser

210

215

220

agg ctt gga cat cac taa

690

Arg Leu Gly His His

225

【 0 0 7 2 】

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 3

gaaggrtgyg tcaayggrca y

21

【 0 0 7 3 】

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

acvggdccaat ydgvaagaaa rtt

23

【 0 0 7 4 】

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

ggccacgcgt cgactagtagt gggiigggii gggiig 36

【 0 0 7 5 】

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 6

aagagactcc ttgaagtaat cggga 25

【 0 0 7 6 】

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

ggccacgcgt cgactagtagt 20

【 0 0 7 7 】

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

aaaatatcgt acgcaaaggg

20

【0078】

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 9

aggaggtccg ctaccctttg

20

【0079】

<210> 10

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 10

cccgatccg accatggcta ccttggttaa aga

33

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明のベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来の色素蛋白質 (B e - G) の吸収スペクトルを測定した結果を示す。横軸は吸収光の波長を示し、縦軸は吸光度を示す。

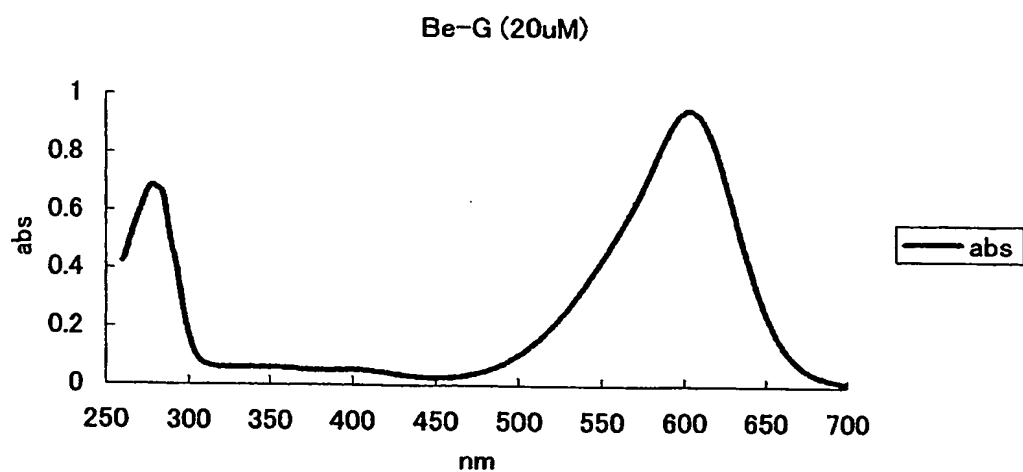
【図2】

図2は、本発明のベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来の色素蛋白質 (B e - G) の吸光スペクトルの pH感受性を示す。横軸はpH値を示し、縦軸は吸光度を示す。605 nmは本発明のベリルイソギンチャク由来の色素蛋白質 (B e - G) 特有の吸光度を示し、277 nmは一般的に蛋白質定量として

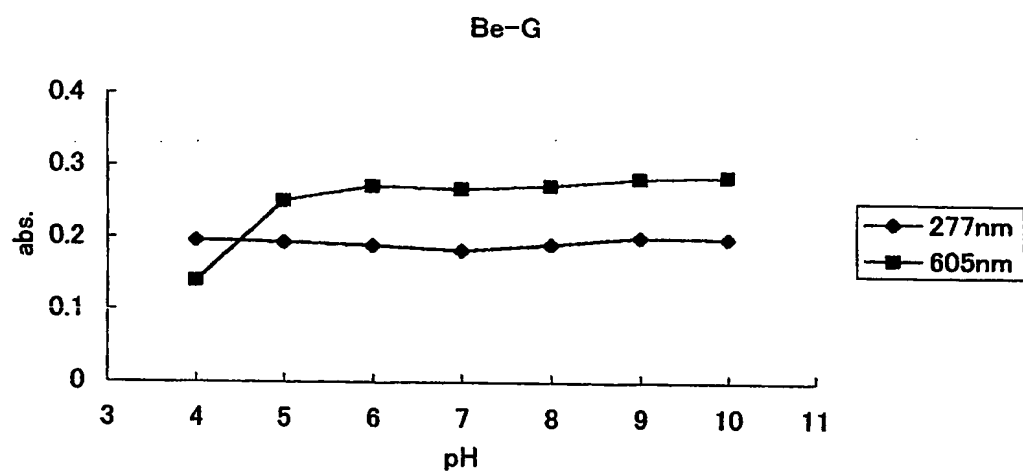
使われる吸光度（芳香族アミノ酸の吸光）を示す。つまり、277 nmの値で蛋白質量が一定である事を示し、605 nmの値で本発明のベリルイソギンチャク由来の色素蛋白質（Be-G）特有の吸光度がpH 5～pH 10においてほとんど変化しないことを示す。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) に由来する、ある特定の波長の光を吸収する新規な色素蛋白質を提供すること。

【解決手段】 ベリルイソギンチャク (*Anthopleura inornata*) 由来の下記の特性を有する色素蛋白質。

- (1) 吸収極大波長が 605 nm である；
- (2) 605 nm におけるモル吸光係数が 47550 である；
- (3) 光吸収特性の pH 感受性が pH 5～10 で安定である；

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 2 4 3 3 3 7

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 6 7 9 2]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県和光市広沢 2 番 1 号

氏 名

理化学研究所

特願 2 0 0 2 - 2 4 3 3 3 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 9 0 0 0 4 0 9 7]

1. 変更年月日

1 9 9 8 年 7 月 2 2 日

[変更理由]

住所変更

住 所

愛知県名古屋市中区丸の内 3 丁目 5 番 1 0 号 住友商事丸の内
ビル 5 F

氏 名

株式会社医学生物学研究所